



**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**



**ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД**

**ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН**



**РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**



**ДЕПАРТАМЕНТ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ  
ЯРОСЛАВСКОЙ ОБЛАСТИ**

## **АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ И ЭКОСИСТЕМЫ**

**МАТЕРИАЛЫ**

**V ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ВОДНОЙ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ,  
ПОСВЯЩЕННОЙ ПАМЯТИ Б.А. ФЛЕРОВА**

**И**

## **СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

**МАТЕРИАЛЫ**

**ШКОЛЫ-СЕМИНАРА ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ**

**Борок, 28 октября - 1 ноября 2014 г.**

**ТОМ 2**

которых недостаточно развита в силу каких-либо индивидуальных особенностей организма, либо ее реакция запаздывает. Серрипес гренландский – глубоководный зарывающийся моллюск, находящийся в непосредственном контакте с донными отложениями. Показатели окислительного стресса у этого моллюска ранее не были исследованы. Несомненно, системы биотрансформации и антиоксидантной защиты у этого вида имеют свои особенности, в отличие, например, от широко используемых при мониторинге мидий, чувствительных к различным типам загрязнения.

При изучении организмов из природных популяций часто бывает сложно интерпретировать результаты по молекулярным биомаркерам, так как их активность зависит от ряда факторов: физиологического состояния, питания, возраста, сезона и связанных с ним колебаний абиотических факторов среды. Тем не менее, эти данные несут важную информацию о реальном состоянии организмов в конкретных условиях естественной среды обитания, и создают основу для дальнейшего изучения загрязнения водоемов.

#### Список литературы

1. Алешко С.А. Действие нефтяных углеводородов на морские организмы на молекулярном уровне // Изв. Тихоокеан. научно-исслед. рыбохоз. центра. 2007. Т. 148. С. 247–261.
2. Атлас двустворчатых моллюсков дальневосточных морей России. /Сост. Явнов С.В. // Атласы промысловых и перспективных для промысла гидробионтов дальневосточных морей России. Владивосток: Дюма, 2000. 168 с.
3. Ирейкина С.А., Лукьянова О.Н. Активность антиоксидантной системы и биотрансформации поллютантов у полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского и Уссурийского заливов (Японское море) // Вопросы рыболовства. 2012. Т. 13. № 1-49. С. 145-154.
4. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 107. С. 179–194.
5. Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D., Walsh A.R. Assessment of glutathione-S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers // Biomarkers. 1997. Vol. 2. P. 51-56.
6. Almeida E.A., Baily A.C.D., Dafre A.L. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed // J. Experiment. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 318. P. 21-30.
7. Doyotte A., Cossu C., Jacquin M. et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus* // Aquat. Toxicol. 1997. Vol. 39. Is. 2. P. 93–110.

УДК 597.555.5:577,1(262,5 + 268,46)

#### ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА В ТКАНЯХ ТРЕСКОВЫХ РЫБ КАК МАРКЕР ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ

И.И. Дорохова<sup>1</sup>, Н.С. Кузьмина<sup>1</sup>, Д.О. Шпинь<sup>2</sup>

*\*Институт биологии южных морей*

*299011 г. Севастополь, Республика Крым, Россия, mirenri@bk.ru*

*\*\*Малая Академия Наук Учащейся Молодежи*

*299055 г. Севастополь, Россия*

Исследована активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в печени и гонадах некоторых видов тресковых рыб. Достоверные половые и видовые отличия в активности фермента установлены только для гонад, что обусловлено нерестом исследуемых рыб.

*Ключевые слова:* тресковые, печень, гонады, щелочная фосфатаза.

Фосфатазы - ферменты, которые отщепляют фосфатные группы от молекул путем гидролиза сложноэфирной связи фосфорной кислоты с образованием фосфат-иона и молекулы со свободной гидроксильной группой. Добавление фосфатной группы может активировать или дезактивировать фермент, поэтому фосфатазы являются неотъемлемой частью многих систем передачи сигнала, в особенности в мембранах. Наиболее распространенной фосфатазой во многих организмах является щелочная фосфатаза (ЩФ, ALP), хотя, встречается и кислая фосфатаза. Щелочные фосфатазы представляют собой группу ферментов, находящихся в основном в печени (изофермент ALP-1) и костях (изофермент ALP-2) животных. Также небольшое количество вырабатывается клетками, выстилающими кишечник (изофермент ALP-3), гонадами и почками (в проксимальных канальцах). В настоящее время

исследования активности ЩФ тканях широко используются при оценке состояния гидробионтов: как для диагностирования болезней печени и костей, нарушений роста, так и в экотоксикологических работах. Тем не менее, работ, посвященных состоянию репродуктивных органов или репродуктивной активности не много. Одновременное исследование состояния ферментов в печени и гонадах позволяет увидеть связь в работе или нарушения в функционировании данных органов.

Известно, что ЩФ является одним из широко используемых маркеров состояния рыб в различных условиях обитания. Так, у трех видов рыб (тиляпии (*Tilapia zillii*), морского языка (*Solea vulgaris*), кефали (*Mugil capito*)) было отмечено снижение активности ЩФ в более загрязненных акваториях и печени, и в мышцах [1]. Исследование влияния сточных вод металлургического завода на печень, жабры и гонады карпа (*Cyprinus carpio*) показало как органоспецифичность, так широкую вариабельность значения активности фермента в зависимости от дозы и времени воздействия [2].

Одним из важных объектов промысла являются трескообразные. Трескообразные — преимущественно морские, холодноводные и придонные рыбы, распространенные в акваториях умеренных областей, имеющее большое практическое значение, так как дают 10—15% мирового улова, занимая второе место после сельдеобразных [3]. Немаловажное значение они играют и в поддержании биоразнообразия и устойчивости экосистем водоемов.

Таким образом, целью данной работы является исследование активности щелочной фосфатазы в печени и гонадах тресковых рыб как биомаркера влияния условий обитания.

Объектами исследования служили морской налим *Gaidropsarus mediterraneus* (Linnaeus, 1758), мерланг *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann, 1840), навага *Eleginus nawaga* (Koelreuter, 1770) и треска *Gadus morhua marisalbi* (Derjugin, 1920).

Треска и навага были отловлены удочкой в сентябре 2012 г. в Кандалакшском заливе Белого моря, в районе биологической станции МГУ им. М.В. Ломоносова (Карелия). Мерланг и трехусый морской налим были получены преимущественно с использованием донных ловушек в зимний период 2012 – 2013 гг. в бухтах Карантинная и Александровская г. Севастополя (Черное море).

Проводили полный биологический анализ рыб, извлекали печень и гонады и замораживали материал при температуре -20° С. Возраст рыб определяли по отолитам. Для анализа использовали 2-х годовалых мерланга и налима и 2-3-летних навагу и треску. Все отобранные экземпляры наваги, мерланга и морского налима находились в состоянии нереста. Яичники трески были на II и III стадиях зрелости, а семенники — на III, IV, IV-V стадиях зрелости.

Определение активности щелочной фосфатазы проводили в экстракте тканей печени и гонад, который получали путем гомогенизации в физиологическом растворе на холоду и центрифугировании при 5000 g 15 минут. Активность ферментов анализировали с использованием стандартного набора реактивов «Філісіт» - «Щелочная фосфатаза» (Украина). ЩФ расщепляет фенилфосфат, с образованием фенола, окисленная форма которого регистрируется при 490-550 нм. Полученные значения экстинкции пересчитывались с учетом содержания белка в гомогенатах тканей. Белок определяли по методу Лоури с использованием стандартного набора «Філісіт» - «Общий белок» (Украина). Результаты обрабатывали статистически, вычисляли среднее значение и ошибку средней.

**Таблица 1.** Уровень активности ЩФ (нмоль/с\*мг) в печени тресковых рыб

район	вид	пол	M±m	Lim	n
Белое море	треска	самки	211.66±103.96	21.65ч1003.19	9
		самцы	131.81±21.11	25.26ч280.89	15
	навага	самки	237.02±136.65	21.5ч1031.86	8
		самцы	138.68±51.8	1.73ч421.25	7
Черное море	мерланг	самки	261.69±87.87	52.31ч1390.91	15
		самцы	738.24±604.71	72.76ч3154.07	5
	трехусый морской налим	самки	847.16±384.12	49.95ч2331.45	7
		самцы	454.99±104.29	240.58ч1010.78	7

В печени тресковых рыб не установлено ни видовых, ни половых отличий в активности исследуемого фермента. Однако следует отметить, что самки наваги, трески и налима имели более высокие значения активности ЩФ, а для черноморских видов характерна большая активность фермента, чем для беломорских. Установлена существенная вариация значений. Следует отметить, что у тресковых, полученных в чистом районе Белого моря активность ферментов в целом ниже, нежели у видов из Черного моря, акватории которого, особенно прибрежные, подвержены большему

антропогенному влиянию. Однако данные отличия могут быть, исключительно видовой особенностью, сложившейся эволюционно под воздействием множества факторов окружающей среды.

**Таблица 2.** Уровень активности ЩФ (нмоль/с • мг) в гонадах тресковых рыб

район	вид	пол	M±m	Lim	n
Черное море	мерланг	самки	2009.77±254.62*	926.20ч3491.76	9
		самцы	828.24±5.58	822.65ч833.82	3
	трехусый морской налим	самки	746.48±67.04**	501.72ч1226.03	10
		самцы	4335.18±866.62 <sup>□</sup>	2812.53ч6289.03	4

Примечание: \* - достоверно выше по отношению к самцам, \*\* достоверно ниже по отношению к самцам, <sup>□</sup> - достоверно по отношению к самцам мерланга

В отличие от печени рыб, в гонадах установлены как половые, так и видовые отличия в активности ЩФ. Для самок мерланга характерна высокая (более чем в 2 раза) активность фермента, в то время как для налима напротив – активность ЩФ в яичниках почти в 6 раз ниже, нежели в семенниках. Выявлены и видовые отличия, достоверные для самцов двух видов и недостоверные, но ярко выраженные для самок. Следует отметить и тот факт, что активность фермента в целом выше в гонадах и меньше варьирует, нежели в печени. Однако, это является следствием того, что все особи отбирались в период нереста или подготовки к нему, а как известно, в этот период гонады являются одним из основных мест синтеза фермента.

Печень является главным органом детоксикации ксенобиотиков, местом синтеза многих веществ, в том числе ЩФ. Активность ЩФ в данном органе зависит от многих факторов: температуры, стадии зрелости гонад, ростовых процессов и пр. Немаловажным является и питание. Кандюк (1966) [3], показано, что активность ЩФ в кишечном тракте рыб зависит от их рациона. В пищеварительном тракте черноморского шпрота активность ЩФ была высокой, что объясняется высокой жирностью пищевых объектов, богатых фосфолипидами. Известно, что у ставриды активность этого фермента была значительно ниже, что автор связывал с разнообразным рационом и менее жирной пищей. Пищевые объекты наваги и трески тоже весьма разнообразны (ракообразные, черви и моллюски, мелкая рыба), что выразилось в невысоких значениях ЩФ в печени. В то время как у черноморских трескообразных количество и качество пищевых объектов другое. В частности, у мерланга в современный период отмечается сужение рациона, и переход в основном на питание рыбами (хамса, султанка, шпрот и сам мерланг), по сравнению с более ранним периодом (наши данные).

ЩФ играет важную роль в функционировании гонад. Проведенные ранее исследования активности ЩФ в яичниках 6 видов сельдевых показали, что видовые отличия обнаруживаются как в зрелых, так и в незрелых гонадах, при этом наибольшие значения активности фермента отмечали в зреющих гонадах, при этом у рыб разных видов по-разному возрастала активность фермента в период созревания. Авторы также установили, что виды с более крупными икринками обычно обладают более низкой активностью ЩФ [5]. Для яичниковой жидкости 4-х видов лососевых характерны существенные видовые отличия в активности исследуемого фермента. ЩФ принимает активное участие в метаболизме фосфолипидов, в частности образовании свободного холина из фосфатидилхолина, который в свою очередь является одним из основных фосфолипидов мембран клеток. Таким образом, ЩФ наряду с протеолитическими ферментами играет важную роль в лизисе фолликулярного эпителия в процессе высвобождения зрелых ооцитов [6]. Все исследованные особи нерестились или находились в состоянии подготовки к нересту, известно, что в это время в организме рыб происходят важные морфологические, гистологические и гистохимические изменения. В это время связь между печенью и гонадами особенно значительна. Печень является основным поставщиком веществ и энергии идущих на постройку ооцитов [7].

Таким образом, активность щелочной фосфатазы в печени и гонадах тресковых рыб является видоспецифичной, обусловленной условиями обитания, питанием, стадией репродуктивного цикла, и другими видовыми особенностями, при этом в период нереста в гонадах, и в некоторой степени в печени, могут проявляться выраженные половые отличия.

#### Список литературы

1. Mohamed F.A.S., Gad N.S. Environmental Pollution-Induced Biochemical Changes in Tissues of *Tilapia zillii*, *Solea vulgaris* and *Mugil capito* from Lake Qarun, Egypt // Global Veterinaria, 2008. – 2 (6) – p. 327-336.
2. Bakde C., Poddar A.N. Effect of steel plant effluent on acid and alkaline phosphatases of gills, liver and gonads of *Cyprinus carpio* Linn. (1758) // International J. of environ. Sci., 2011. – Vol. 1. - No 6. – p.1305 – 1316.

3. Жизнь животных: в 6-ти томах. — М.: Просвещение. Под редакцией профессоров Н.А.Гладкова, А.В.Михеева. 1970.
4. Кандюк Р. П. Сравнительная оценка активности и термостабильности пищеварительных ферментов некоторых планктоноядных и бентосоядных рыб северо-западной части Черного моря / автореферат на соиск. уч. степени канд. биол. наук, 1966. – 23 с.
5. Appa Rao, T. Alkaline phosphatase activity in ovaries of some clupeoides // Indian J. Fish., 1979. - 26 (1 & 2). – p. 253 - 255.
6. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho* // Reprod Nutr Dev., 1995. - 35(5). – p. 465-74.
7. Rosety M., Blanco M., González de Canales M.L., Grau A., Sarasquete M.C. Biochemical parameters during reproduction of the toad fish, *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) // Sci. Mar., 1992. - 56(1). - p. 87-94.

УДК 502.175:632.954:57.084

## ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ ГЛИФОСАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТОВЫХ ОБЪЕКТОВ БИОМОНИТОРИНГА

А.А. Жиденко, Т.В. Мищенко, В.В. Кривопиша

*Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко  
14013 г. Чернигов 13, ул. Гетмана Полуботко, 53, Украина, chnpu@chnpu.edu.ua, zaa2006@ukr.net*

В работе дается экологическая оценка использования глифосата в Черниговской области, приводится сравнительный анализ влияния гербицидов на основе глифосата на различных представителей гидробионтов, а также обосновывается возможность использования карпа в качестве тестового объекта биомониторинга.

В Черниговской области ежегодно увеличиваются площади посевов сои и кукурузы, что приводит к возрастанию динамики применения пестицидов. Так, в Талалаевском районе в 2010 году, по сравнению с 2009 г., посевы сои выросли в 4 раза, кукурузы – на 14%. При этом применение пестицидов в 2009 г. составляло 0.5 т/тыс. гектар, а в 2010 – 0.7 т/тыс. гектар. Рост использования глифосата связан с созданием с помощью генной инженерии растений, толерантных к гербициду. Введение в геномы сои культурной (*Glycine max*) гена стойкости к глифосату с *Agrobacterium tumefaciens* позволяет получить глифосаттолерантную сою, устойчивую к этому гербициду. Генетически модифицированная соя (ГМС) имеет высокую урожайность и разрешена к использованию во многих странах [1]. Именно такая соя может содержаться в большом количестве пищевых продуктов.

Действующее вещество глифосат, которым обрабатываются посевы сои и кукурузы, входит в состав многих гербицидов: факел, глифос, сангли, корфосат, вулкан, раундап и др. Из этих гербицидов сплошного действия наиболее широко используется на Украине и в Черниговской области именно раундап. Так, в Черниговской области ежегодно обрабатывается им около 25 тыс. гектаров полей, в том числе 2600 гектаров в Корюковском р-не, 1300 гектаров в Менском и 2800 гектаров в Ичнянском р-нах. Указанные районы богаты водоемами, к которым сходят стоки с полей, поэтому наличие в них раундапа является предсказуемым.

Различные представители биоты имеют разную чувствительность к действию данного токсического вещества. Как показано [2], водоросли являются наиболее чувствительными к действию глифосата по сравнению с высшими водными растениями, водными беспозвоночными и рыбами. Так, средняя эффективная концентрация (ЭК50) зеленой водоросли (*Scenedesmus quadricauda*) при острой 72-часовой интоксикации составляет 4.4 мг/дм<sup>3</sup>, хроническая 96-часовая NOEC (no observed effect concentration, максимально недействующая концентрация вещества, которая не вызывает видимый эффект) для водорослей составляет 2.0 мг/дм<sup>3</sup>, при этом для ряски горбатой средняя эффективная концентрация (ЭК50) при острой 7-суточной интоксикации составляет 12.0 мг/дм<sup>3</sup>, что указывает на её большую стойкость по сравнению с водорослями. Меньшей чувствительностью обладают рыбы и водные беспозвоночные. Так, СК50 радужной форели при острой 96-часовой интоксикации составляет 38.0 мг/дм<sup>3</sup>, тогда как СК50 водных ракообразных (креветка-мизид) при тех же условиях составляет 40.0 мг/дм<sup>3</sup> [2]. При этом такая же концентрация для других водных беспозвоночных (дафния, блоха большая) не является летальной и составляет среднюю эффективную концентрацию при острой 48-часовой интоксикации. Хроническая токсичность рыб и беспозвоночных также не имеет существенных отличий в данном случае. Для радужной форели максимально недействующая концентрация вещества